



REC'D 30 SEP 2003

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 36.459.1

Anmeldetag: 08. August 2002

Anmelder/Inhaber: Siemens Aktiengesellschaft, München/DE

Bezeichnung: Erkennungsschichten für die Biosensorik

IPC: C 12 Q 1/68

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 13. August 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Remus

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Best Available Copy



Beschreibung

Erkennungsschichten für die Biosensorik

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft eine Immobilisierungsschicht für Biosensoren sowie ihre Verwendung zur Erzeugung von biosensorischen Erkennungsschichten, insbesondere zur Erzeugung von sogenannten DNA-Chips.
- 10 In der modernen biologischen Analysentechnik, aber auch in der medizinischen Diagnostik, werden in zunehmendem Maße Biosensoren eingesetzt, bei denen ein biologisches Erkennungssystem mit einem physikalischen Transducer verknüpft ist. Unter Erkennungssystemen versteht man biologische Erkennungsmoleküle, wie Antikörper, Enzyme, Nucleinsäuren und dergleichen, welche über eine sogenannte Immobilisierungsschicht an einem Träger (Transducer) gebunden sind. Als Transducer werden hauptsächlich kalorimetrische, piezoelektrische, optische und elektrochemische Prinzipien verwendet.
- 20 Die Erkennungssysteme, respektive ursprünglich die Immobilisierungsschichten, werden dabei meist in annähernd zweidimensionalen Schichten auf den Transducersystemen immobilisiert. Die Immobilisierung der Erkennungsmoleküle kann durch kovalente Bindungen, durch Affinitätswechselwirkung aber auch durch hydrophil/hydrophobe Wechselwirkungen erfolgen. Aus Stabilitätsgründen werden kovalente Bindungen bevorzugt, jedoch kommt auch die Bildung stabiler Komplexe, wie zum Beispiel Biotin/Avidin, erfolgreich zum Einsatz. Einen guten
- 30 Überblick über den Aufbau annähernd zwei-dimensionaler biologischer Erkennungsschichten geben I. Willner, E. Katz: "Redoxproteinschichten auf leitenden Trägern - Systeme für bioelektronische Anwendungen" in Angew. Chem. 2000, 112, S. 1230-69.
- 35 Bei Transducer-Oberflächen, welche NH- oder OH-Gruppen enthalten, werden die biologischen Funktionsträger, d.h. die Erkennungsmoleküle, häufig durch Alkoxysilane, welche sogenann-

te Linkergruppen enthalten, aber auch mit Hilfe von Cyanurchlorid oder Carbodiimid immobilisiert. Zur Ausrüstung goldhaltiger Transduceroberflächen werden mit Thiolalkyl gelabelte Erkennungsmoleküle eingesetzt, die über Schwefel-Gold-

5 Bindungen in Form von sogenannten Self-Assembly-Schichten auf der Transduceroberfläche immobilisiert werden. Ein interessanter Ansatz zur Immobilisierung von Nucleinsäuren auf Transduceroberflächen ist die photochemisch unterstützte Synthese von Affymetrix (Light-directed spatially addressable
10 parallel chemical synthesis, S.P.A. Fodor et al., Science 251, 767-773 (1991)).

Zur Steigerung der Empfindlichkeit von Biosensoren sowie zur Optimierung der Reproduzierbarkeit der damit erhaltenen Mess-
15 ergebnisse ist der Einsatz dreidimensionaler Immobilisierungsschichten für die biologischen Erkennungsmoleküle sinnvoll. Die Firma Schleicher & Schüll GmbH bietet unter dem Namen FAST™ Slides DNA-Chips an, in welchen die Fänger-Oligos in einer drei-dimensionalen Nitrocellulose-Membran immobilisiert sind (BioMolecular Screening, Catalog 2001, intern.
20 Edit. Fa. Schleicher & Schüll).

In der WO 00/43539 ist der Aufbau einer dreidimensionalen DNA-Erkennungsschicht durch Immobilisierung der DNA-Fänger-Sonden in Form von Polymer-Brushes beschrieben.
25

Von Timofeev et al. wird ein chemisch modifiziertes, radikalisch vernetztes Polyacrylamid beschrieben, das zum Beispiel für die Immobilisierung von Fänger-Oligos eingesetzt werden
30 kann (E. N. Timofeev et al., Regioselective Immobilization of Short Oligonucleotides to Acrylic Copolymer Gels, Nucleic Acids Research, 1966, Vol.24, No. 16, 3142-3148). Hier werden als Kopplungsgruppen im Hydrogel Amino- oder Aldehydgruppen verwendet. Aldehyd- bzw. Amino-funktionalisierte Fänger-
35 Oligos können an diese Kopplungsgruppen unter reduktiven Reaktionsbedingungen kovalent immobilisiert werden. Das bedeutet aber, dass neben der eigentlichen Kopplungsreaktion zwi-

schen Amino- und Aldehydgruppe, bzw. umgekehrt, ein zusätzlicher Reduktionsschritt unter Einsatz von Reduktionsmitteln erforderlich ist. Weitere von Timofeev et al. beschriebene Methoden zur chemischen Aktivierung des vernetzten Polyacrylamids erfordern ebenfalls zusätzliche Reaktionsschritte in der Polymermatrix.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Erzeugung einer hydrophilen Immobilisierungsschicht für biosensorische Anwendungen auf Basis eines Hydrogels sowie die Verwendung solcher Immobilisierungsschichten zur Erzeugung von Erkennungsschichten durch kovalente Einkopplung biologischer Erkennungsmoleküle.

Die vorliegende Erfindung löst diese Aufgabe unter Verwendung von radikalisch vernetzten oder fotostrukturierten Hydrogelen als Immobilisierungsschicht. Solche Hydrogele sind in den deutschen Patentanmeldungen "Radikalisch vernetzbare Zusammensetzung zur Erzeugung einer Hydrogelschicht" bzw. "Fotostrukturierbare Zusammensetzung zur Erzeugung einer Hydrogelschicht" (Aktenzeichen noch nicht bekannt) der Anmelderin beschrieben.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist demnach einmal eine hydrophile Immobilisierungsschicht für Biosensoren aus einem radikalisch vernetzten Hydrogel auf Basis von Polyacrylamid, wobei die Ausgangszusammensetzung Acrylamid, Vernetzungsmittel, Radikalinitiatoren, wenigstens ein Comonomer mit reaktiven Linkergruppen und gegebenenfalls Weichmacher sowie sonstige Additive umfasst.

Gegenstand der vorliegenden Verbindung ist auch eine hydrophile Immobilisierungsschicht aus einem fotostrukturierten Hydrogel auf Basis von Polyacrylamid, wobei die Ausgangszusammensetzung Acrylamid, Vernetzungsmittel, Fotoinitiatoren, wenigstens einen Filmbildner, wenigstens ein Comonomer

mit reaktiven Linkergruppen und gegebenenfalls Weichmacher sowie andere Additive umfasst.

5 Die erfindungsgemäßen Systeme erlauben den Aufbau von Sensorarrays mit biologischen Erkennungsmolekülen in einer dreidimensionalen Matrix in hoher Integrationsdichte.

Bevorzugte Ausführungsformen bzw. Zusammensetzungen der erfindungsgemäßen hydrophilen Immobilisierungsschichten ergeben
10 sich aus den Unteransprüchen 3 bis 10.

Den Zusammensetzungen können gegebenenfalls weitere Komponenten beigefügt werden, welche die Mischbarkeit der beteiligten Monomere und der Initiatoren gewährleisten. Zur Herabsetzung
15 der Oberflächenspannung können handelsübliche Additive verwendet werden.

Nach Schichtherstellung auf einem Transducersystem und thermischer bzw. Fotovernetzung oder Fotopolymerisation oder Fotostrukturierung bzw. Polymerisationsstrukturierung wird ein
20 mit Wasser quellbares Hydrogel erhalten, in das unter Verwendung der Linkergruppen biologische oder chemische Erkennungsmoleküle für analytische oder diagnostische Anwendungen unter Erhalt ihrer Funktionsfähigkeit eingekoppelt werden können.
25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist demzufolge auch die Verwendung der Immobilisierungsschichten zur Herstellung von biosensorischen Erkennungsschichten durch (kovalentes) Einkuppeln bzw. Immobilisieren von chemischen oder biologischen Erkennungsmolekülen, wobei die Erkennungsmoleküle vorzugsweise
30 se Fänger-Oligonukleotide sind.

Grundsätzlich kann die Ausgangszusammensetzung zur Erzeugung der Hydrogelschicht (Immobilisierungsschicht) mit allen modernen Beschichtungstechnologien auf die geeigneten Träger
35 aufgebracht werden. Bevorzugt werden jedoch Spin-Coating sowie Dispensieren angewendet.

Die Eigenschaften der zu erzeugenden Hydrogelschicht bezüglich Hydrophile, Vernetzungsdichte, Quellbarkeit, etc. lassen sich in weiten Bereichen durch die Art der verwendeten Ausgangskomponenten, deren Verhältnis zueinander und letztendlich der Art der Schichtbildung variieren.

Die Hydrogelmatrix kann an die zum Einsatz kommenden biologischen Erkennungsmoleküle, insbesondere im Hinblick auf die Vernetzungsdichte, angepasst werden. Die Vernetzungsdichte wird durch Art und Konzentration der verwendeten Vernetzermoleküle, wie Acryl- und/oder Methacrylverbindungen, insbesondere Methylenbis(meth)acrylamid und/oder Dimethacrylsäureester, wie Tetraethylenglycoldimethacrylat, gesteuert werden.

Die Hydrogelmischung kann auch an das für den speziellen Anwendungszweck bevorzugte Beschichtungsverfahren angepasst werden.

Für Spin-Coating kommt zum Einen die Verwendung eines polymeren Filmbildners, wie Polyvinylpyrrolidon, Polyacrylamid und/oder Polyhydroxymethacrylat, in Frage. Zum anderen können hochsiedende Lösungsmittel, wie z. B. Ethylenglykol, für die Hydrogelmischung verwendet werden, die beim Spin-Coating nicht vollständig verdampfen und so als Weichmacher in der Schicht verbleiben. Der Restlösemittelgehalt kann dann durch einen Prebake-Schritt vor der Vernetzung gezielt weiter reduziert und somit u.a. die Polymerisationsausbeute bzw. die resultierende Schichtdicke gesteuert werden. Gegebenenfalls können zusätzliche Weichmachersysteme, wie Di- und/oder Triethylenglykol, zugesetzt werden.

Bei der Schichtbildung durch Dispensieren wird die Hydrogelmischung in Lösung je nach Transducerdimensionen in Tropfen in einer Größe von einigen Mikrolitern bis zu einem Nanoliter aufgebracht. Für das Dispensieren werden hochsiedenden Lösemittel, die eine ausreichend lange Lebensdauer des Tropfens

an der Spitze der Dispensierkanüle aufweisen, verwendet. Damit wird das Dosieren und Absetzen des Tropfens reproduzierbar. Andererseits darf der Siedepunkt des Lösungsmittels nicht zu hoch sein, um ein ausreichend rasches Abdampfen des Lösungsmittels aus dem abgesetzten Tropfen zu ermöglichen. Gegebenenfalls ist hier ein Tempersschritt zur Steuerung des Gehalts an Restlösemittel erforderlich. Erfindungsgemäß kommen für das Dispensieren der Hydrogelmischung bevorzugt Dimethylformamid und/oder Ethylenglykol zum Einsatz.

Die Hydrogelmischung kann in Schicht- oder Spotform auf Transducer- oder Trägeroberflächen aus Metall, Glas, Silicium, Siliciumdioxid, Siliciumnitrid oder Kunststoff aufgebracht werden. Es können auch Oberflächen mit Topographie, die aus unterschiedlichen Materialien bestehen, wie z. B. Interdigitalelektrodenarrays auf Siliciumnitrid als Passivierung, beschichtet werden. Die Beschichtung von Flächen schließt auch die Beschichtung innerer Oberflächen von Mikrokanälen oder Nanotubes ein. Die zu beschichtenden Oberflächen sind gegebenenfalls mit einem Haftvermittler beschichtet.

Die Polymerisation und Vernetzung der Hydrogelschicht erfolgt durch thermische oder UV-Initiierung. Bei UV-Initiierung kann auch eine Strukturierung der Hydrogelschicht durch Kontakt- bzw. Proximitybelichtung durch eine Maske erfolgen. Die Hydrogelschicht arbeitet hier wie ein Negativ-Resist. Im bestrahlten Bereich wird polymerisiert und vernetzt. In den abgedunkelten Bereichen findet keine Reaktion statt. Die hier befindliche Hydrogelmischung wird in einem Entwicklungsschritt wieder vom Substrat abgelöst. Hilfskomponenten wie polymere Filmbildner oder Weichmacher können durch Extraktion aus der vernetzten Hydrogelschicht entfernt werden. Dieser Schritt kann unter Umständen zeitgleich mit dem eigentlichen Ausrüstungsschritt erfolgen.

Die bioglogischen oder chemischen Erkennungssysteme werden vorzugsweise aus wässriger Lösung, aus wässriger Pufferlösung

oder aus Gemischen polarer Lösungsmittel mit Wasser auf die Immobilisierungsschicht aufgebracht. Das Aufbringen erfolgt durch Auftropfen oder Aufspotten/Aufdispensieren. In Nanotubes oder Mikrokanäle kann das Heranbringen der Lösung mit den biologischen oder chemischen Erkennungsmolekülen an die vernetzte Hydrogelschicht auch durch den Transport durch das fluidische System selbst erfolgen. Für die zielgenaue Beladung von Messspots werden vorteilhafterweise vernetzte Hydrogelspots verwendet, die von einem Schutzring umgeben sind.

Für das kovalente Ankoppeln der biologischen oder chemischen Erkennungsmoleküle, die mit einer zur im vernetzten Hydrogel vorhandenen Linkergruppe passenden Kopplungsgruppe versehen sind, kann je nach Reaktivität ein Tempersschritt erforderlich sein. Um das Austrocknen der Hydrogelschicht während der Kopplungsreaktion zu verhindern, kann in einer Klimakammer gearbeitet werden. Besonders geeignet für die Ankopplung an die Linkergruppen Epoxyd und Maleinsäureanhydrid sind Aminoalkylgruppen.

Patentansprüche

1. Hydrophile Immobilisierungsschicht für Biosensoren aus einem radikalisch vernetzten Hydrogel auf Basis von Polyacrylamid, wobei die Ausgangszusammensetzung Acrylamid, Vernetzungsmittel, Radikalinitiator(en), wenigstens ein Comonomer mit reaktiven Linkergruppen und gegebenenfalls Weichmacher umfasst.
2. Hydrophile Immobilisierungsschicht aus einem fotostrukturierten Hydrogel auf Basis von Polyacrylamid, wobei die Ausgangszusammensetzung Acrylamid, Vernetzungsmittel, Fotoinitiator(en), wenigstens einen Filmbildner, wenigstens ein Comonomer mit reaktiven Linkergruppen und gegebenenfalls Weichmacher umfasst.
3. Hydrophile Immobilisierungsschicht nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Vernetzungsmittel eine Acryl- und/oder Methacrylverbindung ist.
4. Hydrophile Immobilisierungsschicht nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Vernetzungsmittel Methylenbis(meth)acrylamid und/oder Dimethacrylsäureester ist.
5. Hydrophile Immobilisierungsschicht nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Comonomer mit reaktiven Linkergruppen Maleinsäureanhydrid und/oder Glycidyl(meth)acrylat ist.
6. Hydrophile Immobilisierungsschicht nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Weichmacher Mono-, Di- und/oder Triethylenglycol ist.

7. Hydrophile Immobilisierungsschicht nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausgangszusammensetzung, in einem polaren, mit Wasser mischbaren Lösungsmittel vorliegt.

5

8. Hydrophile Immobilisierungsschicht nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Lösungsmittel Dimethylformamid ist.

10

9. Hydrophile Immobilisierungsschicht nach einem der Ansprüche 2 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Filmbildner Polyvinylpyrrolidon, Polyacrylamid und/oder Polyhydroxymethacrylat ist.

15

10. Hydrophile Immobilisierungsschicht nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf Transducer- oder Trägeroberflächen aus Metall, Glas, Silicium, Siliciumdioxid, Siliciumnitrid, Kunststoff oder auf Oberflächen mit Topographie erzeugt ist.

20

11. Verwendung der Immobilisierungsschicht nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung von biosensorischen Erkennungsschichten durch (kovalentes) Einkuppeln bzw. Immobilisieren von chemischen oder biologischen Erkennungsmolekülen.

25

12. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Erkennungsmoleküle Fänger-Oligonukleotide sind.

30

Zusammenfassung

Erkennungsschichten für die Biosensorik

- 5 Hydrophile Immobilisierungsschicht für Biosensoren aus einem radikalisch vernetzbaren Hydrogel auf Basis von Polyacrylamid, wobei die Ausgangszusammensetzung Acrylamid, Vernetzungsmittel, Radikalinitiator(en), wenigstens ein Comonomer mit reaktiven Linkergruppen und gegebenenfalls Weichmacher
- 10 umfasst, oder aus einem fotostrukturierten Hydrogel auf Basis von Polyacrylamid, wobei die Ausgangszusammensetzung Acrylamid, Vernetzungsmittel, Fotoinitiatoren, wenigstens einen Filmbildner, wenigstens ein Comonomer mit reaktiven Linkergruppen und gegebenenfalls Weichmacher umfasst.

15